

## G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis の脳組織における糖脂質の Heterogeniety に関する研究

石 川 幸 辰

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

### Studies on Heterogeniety of Brain Glycosphingolipids from G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis

Yukitoshi ISHIKAWA

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. T. Nakao)

Analysis and characterization of brain glycosphingolipids were performed in four autopsied cases of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis (two cases of type 1 and two cases of type 2) and two affected fetuses (a case of type 1 and a case of type 2). The following results were obtained.

1) In neutral glycosphingolipids of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis infant brains, globo-series glycolipids (GbOse<sub>3</sub>Cer, GbOse<sub>4</sub>Cer), which were not detectable in adult brains, were increased and the accumulation of asialo-G<sub>M1</sub> was proportionally related to that of G<sub>M1</sub>-ganglioside except for one case of type 1. On the other hand, TLC-pattern of neutral glycosphingolipids in the case without the accumulation of asialo-G<sub>M1</sub> was similar to that of the fetal control brain.

2) The early onset of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis showed a greater degree of accumulated G<sub>M1</sub>-ganglioside. The accumulation rate of G<sub>M1</sub>-ganglioside was more progressive in the cases of type 1 than that in the cases of type 2.

3) Galacto-glycosphingolipids such as galactosylceramide, sulfatide and G<sub>M4</sub>-ganglioside, which were enriched in myelin, were reduced in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis infant brains as compared to normal controls. These constituent fatty acids had lower contents of 2-hydroxy fatty acids and the acids longer than 22 carbon number than those in normal controls.

4) Glycosphingolipids belonging to the globo-, ganglio- and neolacto-series were found in both the control and affected fetal brains, although remarkable differences between control and affected brains were not demonstrated in their contents, respectively.

5) The accumulation of G<sub>M1</sub>-ganglioside in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis type 1 was already observed in the fetal period, but not in type 2. (Received September 17, 1984 and accepted September 25, 1984)

**Key words:** G<sub>M1</sub>-gangliosidosis type 1, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis type 2, Affected fetus,  
Brain glycosphingolipids

### 緒 言

G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は, 1959 年, Norman *et al.*<sup>1)</sup>

により, 内臓に病変をみる Tay-Sachs 病 (Tay-Sachs disease with visceral involvement) として初めて報告された. 1964 年, Landing *et al.*<sup>2)</sup> は, 従来,

#### Abbreviations:

TLC : thin-layer chromatography  
GLC : gas-liquid chromatography  
GC-MS : gas chromatography-mass spectrometry  
<sup>1</sup>H-NMR : proton nuclear magnetic resonance  
NeuAc : N-acetylneuraminic acid  
GalCer : galactosylceramide  
GlcCer : glucosylceramide  
CMH : ceramide monohexoside

LacCer : lactosylceramide (ceramide dihexoside, CDH)  
GbOse<sub>3</sub>Cer : globotriaosylceramide (ceramide trihexoside, CTH)  
GbOse<sub>4</sub>Cer : globotetraosylceramide (globoside)  
GgOse<sub>3</sub>Cer : gangliotriaosylceramide (asialo-G<sub>M2</sub>)  
GgOse<sub>4</sub>Cer : gangliotetraosylceramide (asialo-G<sub>M1</sub>)  
nLcOse<sub>4</sub>Cer : neolactotetraosylceramide (paragloboside)  
FucnLcOse<sub>4</sub>Cer : fucosyl neolactopentaosylceramide

“Hurler-variants”, “pseudo-Hurler disease”として報告された症例の臨床像、骨X線の変化、病理組織を詳細に検討し、“Familial neurovisceral lipidosis”としてまとめた。同年、O'Brien *et al.*<sup>3)</sup>は、上記の疾患の脳及び内臓(肝・腎)を分析し、Tay-Sachs病とは異なる ganglioside の蓄積を認め、“generalized gangliosidosis”と命名し、Gonatas and Gonatas<sup>4)</sup>も別個に、脳において正常に認められる G<sub>M1</sub>-ganglioside の蓄積を確認した。Okada and O'Brien<sup>5)</sup>は、1968年、本症の脳・内臓諸臓器で、リソゾーム由来の水解酵素である G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase の欠損を証明し、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は遺伝性リソゾーム蓄積性疾患として確立された。一方、その後の症例の集積から、1968年、Derry *et al.*<sup>6)</sup>は、G<sub>M1</sub>-gangliosidosisを、乳児早期に発症し、肝・脾腫及び骨変化を伴い、急速に退行性変化を示す乳児型(type 1)と肝・脾腫及び骨変化を伴わず1歳頃より発症し経過の緩徐な若年型(type 2)の2つの型に分類することを提唱した。しかし、発症・死亡年齢、顔貌異常、肝・脾腫大、骨変化、cherry red spotsの有無など臨床的に明確に分類できない症例も報告されている<sup>7-9)</sup>。また、最近では、小脳症状を主体とし成人に発症する adult type の報告もなされている<sup>10-12)</sup>。

Ledeer *et al.*<sup>13)</sup>が、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の大脳に蓄積する monosialo-ganglioside は、正常の構造を有する G<sub>M1</sub>-ganglioside (以下 G<sub>M1</sub> と略す)であることを報告以来、蓄積物質に対する生化学的なアプローチがなされてきた。Suzuki and Chen<sup>14)</sup>は、脳灰白質において、G<sub>M1</sub>の他に、その asialo 誘導体である asialo-G<sub>M1</sub> (ceramide tetrahexoside) の著しい蓄積を報告した。一方、臓器においては、G<sub>M1</sub>の他に、非還元末端にガラクトースを有する糖ペプチド<sup>15)</sup>、オリゴ糖<sup>16)</sup>及びケラト硫酸に類似しガラクトースとガラクトサミンを主な構成糖としてシアル酸を含む sialomucopolysaccharide<sup>17)</sup>の蓄積が報告されている。最近、Yamashita *et al.*<sup>18)</sup>は、[Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1→]を非還元末端に有するオリゴ糖が本症患者尿中に排泄されており、type 1 と type 2 由来の患者尿では、このオリゴ糖の排泄パターンに差が認められる<sup>19)</sup>と報告している。しかし、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の臨床型と脳・肝での蓄積物質の質的・量的相関について詳細に述べた報告は殆どない。

著者は、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 患者4例の剖検大脳より、糖脂質を分離・精製し、その化学構造を確かめ、臨床像と脳糖脂質の質的・量的異常との対応について比較検討したので報告する。さらに、出生前診断により

得られた2例の胎児脳の分析も行なったので同様の検討を加え報告する。

## 2 研究対象

分析対象として、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 罹患の4例の小児脳及び出生前診断にて得られた2例の罹患胎児脳を用いた。得られた剖検脳は、分析まで-70℃で3か月から10年保存した。

### 2.1 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis 小児脳

最近までに、当教室で経験した G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は、計7症例である。この内、剖検の得られた3症例及び岐阜大学小児科より分与された1症例の剖検大脳を分析対象とし、臨床像より G<sub>M1</sub>-gangliosidosis type 1及び2に分類した(Table 1)。正常対照として、6か月、3歳、5歳、12歳の中樞神経系病変の認められない剖検脳を用いた。

### 2.2 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis 胎児脳

Case 1及びCase 3の at high risk mother に対して、出生前診断がなされた。Case 1の第2子(type 1 fetus)及びCase 3の第3子(type 2 fetus)は、各々、妊娠第15週及び第17週で amniocentesis が施行され、培養羊水細胞中の  $\beta$ -galactosidase 欠損により、妊娠第24週に治療的人工流産がなされた(各々 type 1 及び type 2 fetus と略す)。正常対照として、社会的経済的理由で人工妊娠中絶がなされた妊娠第22~23週の胎児脳(5例)を用いた。

## 3 研究方法

### 3.1 小児脳からの糖脂質の分離・精製

剖検大脳は実験に際し、4℃下、一昼夜、融解した。血管・結合織をとり除いた脳組織を湿重量に対して6容量の冷アセトン中でホモジェナイズし、4℃下、1,500 rpm., 15分間遠心し、アセトン可溶成分を含む上清を除き、アセトン不溶成分を風乾した。得られたアセトンパウダーは、8容量のクロロホルム(chloroform, C)ーメタノール(methanol, M) (2:1, V/V)で脂質を抽出し吸引濾別した。残渣は、5%の水を加えた6容量の C-M (1:2, V/V)で再抽出を行ない、先の抽出液と合せて複合脂質画分とし、ロータリーエバポレーターで40℃以下で減圧乾固した。なお、出発材料として、Case 1及び3は、各々湿重量で5g、Case 2は、20g、Case 4は、15gを用いた。

#### 3.1.1 方法(I)

Case 1, 3及び対照小児脳に対しては、以下の方法で行なった。

**Table 1** Clinical and enzymatic findings on four cases of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis.

| Clinical type                        | Type 1                        |            | Type 2 |        |      |                                         |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------|--------|--------|------|-----------------------------------------|
|                                      | Case 1                        | Case 2     | Case 3 | Case 4 |      |                                         |
| Onset                                | 3M                            | 5M         | 12M    | 16M    |      |                                         |
| Age at death                         | 4Y3M                          | 2Y9M       | 8Y3M   | 11Y2M  |      |                                         |
| Abnormal facies                      | (+)                           | (+)        | (-)    | (-)    |      |                                         |
| Cherry red spots                     | (+)                           | (-)        | (-)    | (-)    |      |                                         |
| Hepatosplenomegaly                   | (++)                          | (+)        | (-)    | (-)    |      |                                         |
| Bone involvement                     | (+++)                         | (+++)-(++) | (+)    | (+)    |      |                                         |
| Vacuolated lymphocytes               | (+++)                         | (++)       | (+)    | (+)    |      |                                         |
| $\beta$ -Galactosidase <sup>a)</sup> |                               |            |        |        |      |                                         |
| Leukocytes                           | 4-MU <sup>b)</sup>            | 2          | 3      | 6      | 7.7  | Control range <sup>56)</sup><br>120-265 |
|                                      | G <sub>M1</sub> <sup>c)</sup> | 0          | 0      | 0.03   | 0.48 |                                         |
| Autopsied brain                      | 4-MU <sup>b)</sup>            | n. d.      | 8      | n. d.  | 11   | 73-111                                  |
|                                      | G <sub>M1</sub> <sup>c)</sup> | n. d.      | 0.02   | n. d.  | 0.03 | 20- 30                                  |

<sup>a)</sup> Activities were expressed as nanomol/mg protein/hour.

<sup>b)</sup> 4-MU, 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.

<sup>c)</sup> G<sub>M1</sub>, <sup>3</sup>H-G<sub>M1</sub>-ganglioside.

Abbreviation: n. d., not determined.

3 g の DEAE-Sephadex A-25<sup>20)</sup> (Pharmacia 社) を C-M-0.8 M 酢酸アンモニウム (30:60:8) (A 溶媒) で一昼夜、平衡後、C-M-water(W) (30:60:8) (B 溶媒) でよく洗い、洗浄液がネスラー試薬陰性となるまで行なった。先に得られた複合脂質画分を C-M (2:1) 40 ml に溶解し、B 溶媒の組成になる様に調整し、DEAE カラム ( $\phi$  1.2 cm  $\times$  10 cm, acetate form) にのせ、流速 0.5 ml/分 で流出した。さらに、B 溶媒 100 ml ですみやかに溶出し、中性複合脂質画分を得た。酸性複合脂質画分は、A 溶媒 250 ml で溶出されてくる。中性複合脂質画分は、ロータリーエバポレーターで乾固後、5 ml のピリジノー無水酢酸 (3:2) に溶解し、70°C, 1 時間アセチル化した。さらに、5 g の Florisil カラム<sup>21)</sup> ( $\phi$  1.0 cm  $\times$  10 cm) にのせ、50 ml のジクロロエタノーアセトン (1:1) でアセチル化糖脂質画分を分離した。0.5% ナトリウムメトキシド・メタノール溶液で、37°C, 30 分間、脱アセチル化し、一昼夜、4°C 水に対して透析した。

先の酸性複合脂質画分は、弱アルカリ水解、透析、乾固後、クロロホルムで調整したケイ酸カラム (Iatrobeads 6RS, Iatron 社,  $\phi$  1.2 cm  $\times$  15 cm) にのせ、スルファチドとガングリオシドに分離した。ceramide monohexoside (CMH), asialo-G<sub>M1</sub>, G<sub>M1</sub> は、調製用薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) で展開後、ヨード蒸気で各々の該当部分を検出し、C-M-W (10:10:1) にて糖脂質を抽出し回収した。

### 3.1.2 方法(II)

Case 2 及び 4 に対しては、以下の方法で行なった。

DEAE-Sephadex A-25 カラム (5 g,  $\phi$  1.2 cm  $\times$  20 cm, acetate form) で中性複合脂質画分を分離した後、カラムを 1 カラムベッド容量のメタノールで洗浄した。中性複合脂質画分は<sup>22)</sup>、アセチル化、Florisil カラムで精製後、この画分を Iatrobeads カラム ( $\phi$  1.2 cm  $\times$  50 cm) にのせ、C-M-W (83:16:0.5~55:42:3) の直線濃度勾配で溶出し、6 種類の糖脂質を得た。

酸性複合脂質画分は<sup>23)</sup>、先に述べた DEAE カラムを各々 3 カラムベッド容量の 0.05 M, 0.15 M, 0.45 M 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の concave 濃度勾配で溶出した。溶出プロファイルは、各フラクションの一部をとり、シアル酸の定量を行ないモニターした。溶出液は、TLC の結果を考慮して、monosialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo-ganglioside の四画分に分離し、各々透析、乾固した。スルファチドは、disialo 画分に含まれた。さらに各画分は、Iatrobeads カラムにより再クロマトを行なった。Monosialo 画分に対して、C-M-W (60:40:2~30:70:4), disialo 画分は、(55:45:2~20:80:4), trisialo 画分は、(55:50:2~20:80:4)。

### 3.1.3 Thin-layer chromatography

TLC-plate (silica gel 60, Merk 社) は、以下の展開系を用いた。solvent I, C-M-W (65:25:4); solvent II, (60:35:8); solvent III, (55:45:10, 0.2% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 含有)。中性糖脂質画分には、

ヘキソース量として 50  $\mu\text{g}$ , ガングリオンド画分には, シアル酸量として 50  $\mu\text{g}$  相当をアブライした. 発色は以下の条件で行なった. 中性糖脂質: オルシノール硫酸スプレー, 110 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分. ガングリオンド: 塩酸レゾルシノールスプレー, 95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 分.

### 3.2 糖脂質の構造決定

方法(II)で精製した各糖脂質は, TLC にて均一であることを確認した. 糖脂質は, 糖及び脂肪酸組成を分析し, かつ, 糖脂質の糖鎖の配列, 結合位, アノマーの分析により, その化学構造を調べた.

#### 3.2.1 糖及び脂肪酸組成

精製された糖脂質 100  $\mu\text{g}$  を, 5%無水塩酸メタノール 1 ml を加え, 85 $^{\circ}\text{C}$ , 4 時間, メタノリシスした<sup>24)</sup>. 1 ml の *n*-ヘキサンで 3 回脂肪酸メチルエステルを抽出した. メタノール層を, 窒素下で乾固後, ピリジーン-トリメチルクロロシラザン-ヘキサメチルジシラザン(5:1:2) 50  $\mu\text{l}$  で trimethylsilyl (TMS) 化し, TMS 化糖としてガスクロマトグラフ(gas-liquid chromatography, GLC; Shimadzu GC-4BM) で分析した. 分析条件は, カラム: 1.5 m, 2% OV-1 on Chromosorb AW; 150 $^{\circ}\text{C}$ ~230 $^{\circ}\text{C}$ , 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  昇温; キャリアーガス:  $\text{N}_2$  50 ml/min; 検出器, FID. 一方, ヘキサン層は乾固後, 2-hydroxy 脂肪酸の存在を考慮して 70 $^{\circ}\text{C}$ , 1 時間, ピリジーン-無水酢酸(3:2) でアセチル化し, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS, Hitachi RMU-6MG; 2% OV-1 カラム, 1.5 m; 150 $^{\circ}\text{C}$ ~280 $^{\circ}\text{C}$ , 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  昇温; 002B datalizer; 加速電圧 3200 V; イオン源, 20 eV;  $1.0 \times 10^{-7}$  torr) で脂肪酸ピークを同定した. 同定は, 基準イオン (*m/e* 74, 飽和脂肪酸; *m/e* 55, 不飽和脂肪酸; *m/e* 43, hydroxy 脂肪酸) を用いた mass-chromatography 法で行なった.

#### 3.2.2 グリコシダーゼ処理

各糖脂質の糖鎖の結合順位及びアノマーを解析するために, シアリダーゼ, その他のエキソグリコシダーゼによって逐次加水分解し, その分解産物を TLC によって検出した.

精製した中性糖脂質(100  $\mu\text{g}$ ), タウロデオキシコール酸ナトリウム(200  $\mu\text{g}$ ), グリコシダーゼ( $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from jack bean, 生化学工業;  $\alpha$ -galactosidase from beef kidney, Boehringer Mannheim;  $\beta$ -galactosidase from jack bean, 生化学工業), 50 mM クエン酸緩衝液(pH 4.0)で 400  $\mu\text{l}$  とし, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 一昼夜, インキュベートし, その一部をとり TLC (solvent I 系で展開) で分解産物を検出し

た. 残りはさらに次のグリコシダーゼを加えインキュベートした.

ガングリオンド (50  $\mu\text{g}$ ), デオキシタウロコール酸ナトリウム (200  $\mu\text{g}$ ), シアリダーゼ (Arthrobacter ureafacies, Nakarai Chem. Co.; Clostridium perfringens, Sigma), 50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5)で 400  $\mu\text{l}$  とし, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 2 時間及び 24 時間インキュベートした. 分解産物を, TLC (solvent II 系又は III 系で展開) で検出した.

#### 3.2.3 メチル化分析

糖脂質の糖鎖の結合位を調べるため, 糖脂質 (100  $\mu\text{g}$ ) を Hakomori 法<sup>25)</sup> により完全メチル化した. 糖脂質を 4M-ジメチルスルフィニルカルバニオン(DSC in DMSO) 0.5 ml に溶解し, 室温下, 5 時間かくはんし, 氷冷下, ヨウ化メチル 1 ml を加えよくかくはんし, C-W(1:1) 3 ml を加えてクロロホルム層をとり, メチル化糖脂質を得た. 次に, Stellner *et al.*<sup>26)</sup> の方法に従って, アセトリシス・還元・アセチル化を行ない部分メチル化糖アルコール・アセテートとし, GC-MS で同定した. GC-MS は, 以下の条件で行なった.

GLC: 中性糖誘導体に対して, 1.5 m, 3% ECNSS-M カラム, 170 $^{\circ}\text{C}$  及び 1.5 m, 3% OV-225 カラム, 190 $^{\circ}\text{C}$ . アミノ糖誘導体に対して, 3% ECNSS-M カラム, 200 $^{\circ}\text{C}$  で行なった.

完全メチル化ガングリオンドの一部は, シアル酸結合位を調べるため, 0.3N 無水塩酸メタノールで, 80 $^{\circ}\text{C}$ , 1 時間メタノリシスし, TMS 化を行ない, 1.5 m, 2% OV-101 カラム, 200 $^{\circ}\text{C}$  で GC-MS 分析した<sup>27)</sup>. MS の条件は, 脂肪酸分析と同条件で行なった.

各単糖誘導体より得られたマス・フラグメントの結果は, published data<sup>26,28,29)</sup> を参照し同定した.

### 3.3 胎児脳の分析

罹患胎児脳は, 湿重量で 3 g 用い, 方法(I)に従って分析した. 対照脳は, 150 g を用いて, 方法(II)に従って分析した.

### 3.4 糖脂質の定量

単離された糖脂質に対して, 各々ヘキソース<sup>30)</sup>, ヘキソサミン<sup>31)</sup>, シアル酸量<sup>32)</sup> を比色定量した. 中性糖脂質及びガングリオンド画分での糖脂質含量は, TLC 二波長クロマトスキャナ (Hitachi CS-910) で求めた. スキャンの条件は, 中性糖脂質: sample 側 540 nm, reference 側 800 nm, スリット 10 $\times$ 0.1 mm; ガングリオンド, sample 側 580 nm, reference 側 800 nm, スリット 0.25 $\times$ 0.1 mm でリニア・スキャン (スキャン速度: 20 cm/min) した. 標準糖脂質として北海道大学

癌研究所・生化学部門牧田章教授より分与された ceramide monohexoside (CMH), ceramide dihexoside (CDH), ceramide trihexoside (CTH), globoside を用いた。

### 3・5 糖脂質のプロトン核磁気共鳴スペクトル

Case 2 からの G<sub>M1</sub> 及び対照胎児脳での未同定の中性糖脂質 “X” 及び “Y” は、プロトン核磁気共鳴 (proton nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H-NMR, Varian JNM-FX200, フーリエ変換) スペクトルを測定した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルは、以下の条件で行なった。

G<sub>M1</sub> は 5 mg, 未同定の中性糖脂質 “X” 及び “Y” は、各々 1 mg 弱を用い、0.4 ml の dimethyl sulfoxide-d<sub>6</sub> (Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>) またはこれに 50  $\mu$ l の D<sub>2</sub>O を含んだ Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> に溶解し、frequency: 400MHz, step width: 2 KHz, 90 °C, tetramethylsilane を内部標準として chemical shift ( $\delta$ , ppm) を求めた。Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> 中の糖脂質は、Sephadex LH-20 カラム ( $\phi$  1  $\times$  25 cm, Pharmacia 社) で回収した。糖脂質の anomeric proton, amide proton, methyl proton の chemical shift は、published data<sup>33,34)</sup> を参照し同定した。

## 4 成 績

### 4・1 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis 小児脳の糖脂質

C-M 抽出, DEAE-Sephadex A-25 カラム, Iatrobeds カラム, Florisil カラムにより、本症小児脳から、

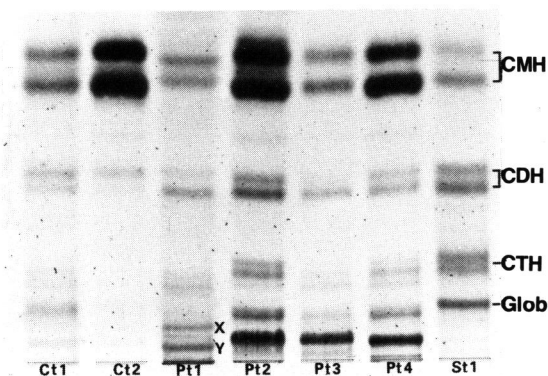


Fig. 1 Thin-layer chromatogram of neutral glycosphingolipid fractions from four cases of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. Ctl, control brain 1 (6 months); Ctl2, control brain 2 (3 years); Pt 1-4, patient brain 1-4; St1, standard mixture (CMH, CDH, CTH, globoside).

TLC-plate was developed with solvent system I and visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> spray.

6 種類の中性糖脂質, 8 種類のガングリオンドを分離・精製した。

#### 4・1・1 糖脂質の薄層クロマト・パターン

Fig. 1 に、中性糖脂質画分の TLC パターンを示す。Case 1 では、Case 2, 3, 4 と異なるバンド “X” 及び “Y” が認められた。Case 2 及び Case 4 から、A~F の 6 種類の糖脂質が分離・精製された (Fig. 2)。Fig. 3 に、ガングリオンド画分の TLC パターンを示す。ガングリオンドの命名法は、Svennerholm<sup>35)</sup> に従った。

#### 4・1・2 糖脂質の糖組成

Table 2 に、糖脂質の糖鎖の糖組成を示す。A は、CMH であるが、Case 2 では、約 20% の glucosylcera-

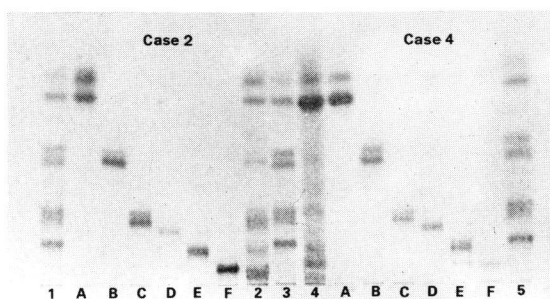


Fig. 2 Thin-layer chromatogram of isolated neutral glycosphingolipids from G<sub>M1</sub>-gangliosidosis (Case 2 and Case 4). 1, 3, 5, standard mixture (CMH, CDH, CTH, globoside); 2, neutral glycosphingolipid fraction from Case 2; 3, neutral glycosphingolipid fraction from Case 4; A-F, isolated neutral glycosphingolipids.

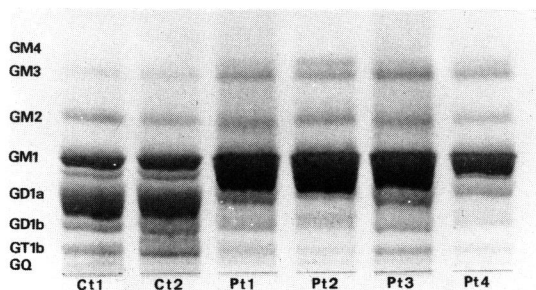


Fig. 3 Thin-layer chromatogram of gangliosides from four cases of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis. Ctl, control brain 1 (6 months); Ctl2, control brain 2 (3 years); Pt1-4, patient brain 1-4.

TLC-plate was developed with solvent system II and visualized with resorcinol-HCl spray.

Table 2 Carbohydrate composition of brain glycosphingolipids in  $G_{M1}$ -gangliosidosis.

| Glycolipids on TLC          | Case 2 |                   |        |       | Case 4 |                   |        |       |
|-----------------------------|--------|-------------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|-------|
|                             | Glc    | Molar composition |        | NeuAc | Glc    | Molar composition |        | NeuAc |
|                             |        | Gal               | GalNAc |       |        | Gal               | GalNAc |       |
| Neutral glycosphingolipids: |        |                   |        |       |        |                   |        |       |
| A                           | 0.25   | 1.00              | —      | —     | 0.02   | 1.00              | —      | —     |
| B                           | 1.00   | 1.12              | —      | —     | 1.00   | 1.13              | —      | —     |
| C                           | 1.00   | 1.87              | —      | —     | 1.00   | 1.80              | —      | —     |
| D                           | 1.00   | 1.34              | 0.70   | —     | 1.00   | 1.24              | 0.80   | —     |
| E                           | 1.00   | 1.92              | 0.73   | —     | 1.00   | 1.66              | 0.75   | —     |
| F                           | 1.00   | 1.91              | 0.64   | —     | 1.00   | 2.10              | 0.72   | —     |
| Gangliosides:               |        |                   |        |       |        |                   |        |       |
| $G_{M4}$                    |        | ND                |        |       | —      | 1.00              | —      | 0.63  |
| $G_{M3}$                    | 1.00   | 0.95              | —      | 0.84  | 1.00   | 1.11              | —      | 1.06  |
| $G_{M2}$                    | 1.00   | 1.06              | 0.60   | 0.78  | 1.00   | 1.20              | 0.79   | 0.63  |
| $G_{M1}$                    | 1.00   | 1.94              | 0.82   | 1.17  | 1.00   | 1.59              | 0.64   | 0.75  |
| $G_{D1a}$                   | 1.00   | 1.56              | 0.83   | 1.52  | 1.00   | 1.57              | 0.77   | 1.65  |
| $G_{D1b}$                   | 1.00   | 1.53              | 0.76   | 1.75  | 1.00   | 2.27              | 0.83   | 1.93  |
| $G_{T1b}$                   | 1.00   | 1.81              | 0.65   | 2.45  | 1.00   | 1.80              | 0.51   | 2.60  |
| $G_Q$                       |        | ND                |        |       |        | ND                |        |       |

Abbreviations: —, not detected; ND, not determined.

amide (GlcCer) が認められたが, Case 4 では, 2% を占めるにすぎなかった. B は, Glc: Gal=1:1 より, lactosylceramide (LacCer, CDH) である. C, D は, ceramide trihexoside, E, F は, ceramide tetrahexoside である.  $G_{M4}$  は, Gal: NeuAc=1:1 であることより, sialylgalactosylceramide である.  $G_{M1}$ ~ $G_Q$  までシアル酸を除く糖組成は, Glc: Gal: GalNAc=1:2:1 の構成であった. スルファチドは, ガラクトースのみで, グルコースは認めなかった.

#### 4.1.3 グリコンダーゼ処理

Table 3 に, 糖脂質のグリコンダーゼ処理の結果を示す. D~F の最終分解産物は, GLC の分析の結果, GlcCer であった.  $G_{M3}$ ,  $G_{M2}$  及び  $G_{M1}$  は, シアリダーゼ処理の結果, 各々中性糖脂質の B, D 及び F と TLC の Rf 値が一致した.  $G_{D1a}$ ,  $G_{D1b}$  及び  $G_{T1b}$  は, Arthrobacter 由来のシアリダーゼの短時間処理(2時間)では,  $G_{M1}$  が主な分解産物であり, 長時間処理により, そのアシアロ誘導体(F)が得られたが, 30%~50%しか生成されなかった.  $G_{T1b}$  は, Clostridium 由来のシアリダーゼ処理により, 一部,  $G_{D1b}$  が生成され, Arthrobacter 由来のシアリダーゼ処理では, アシアロ誘導体(F)が生成され,  $G_{D1b}$  は認めなかった. 以上の結果から, Arthrobacter 由来のシアリダーゼは, 糖鎖の内部及び

非還元端に結合するシアル酸には作用するが, Clostridium 由来のシアリダーゼは, 糖鎖内部に結合するシアル酸には, 作用しないことがわかった.

#### 4.1.4 メチル化分析

糖脂質の糖鎖の結合位を, 部分メチル化糖アルコール誘導体の GC-MS 分析により分析した (Table 4).  $G_{M4}$ ~ $G_{D1a}$  でのシアル酸は, C4, C7, C8, C9 位のメチル化された完全メチル化シアル酸のみであるのに対して,  $G_{D1b}$  及び  $G_{T1b}$  では, シアル酸の C8 位が TMS 化された部分メチル化シアル酸が存在しており, シアリダーゼ処理の結果と合せて,  $G_{D1b}$  及び  $G_{T1b}$  では, シアル酸が ( $\alpha$  2-8) 結合していることが示唆された.

#### 4.1.5 糖脂質の化学構造

糖脂質の糖組成, グリコンダーゼ処理, メチル化分析により, 分離・精製された糖脂質の化学構造は, Fig. 4 のごとくであった. C 及び E は, Gal $\alpha$ 1-4LacCer の基本糖鎖構造を有するグロボ系糖脂質であり, D 及び F は, GalNAc $\beta$ 1-4LacCer の基本糖鎖をもつガングリオ系列であった.

#### 4.1.6 糖脂質の含量

Table 5 に, 脳糖脂質の含量を示す.

中性糖脂質において, Case 1 は, Case 2~4 と異なり, asialo- $G_{M1}$  ( $G_{G0se4Cer}$ , F) の蓄積を認めず, 糖

Table 3 Enzymatic hydrolysis of brain glycosphingolipids in G<sub>M1</sub>-gangliosidosis.

| Glycolipids on TLC          | 1st enzyme       | Products <sup>a)</sup>                           | 2nd enzyme       | Products <sup>a)</sup> | 3rd enzyme      | Products <sup>a)</sup> |
|-----------------------------|------------------|--------------------------------------------------|------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
| Neutral glycosphingolipids: |                  |                                                  |                  |                        |                 |                        |
| D                           | $\beta$ H'ase    | CDH (100%)                                       | $\beta$ Gal'ase  | CMH (100%)             |                 |                        |
| E                           | $\beta$ H'ase    | CTH (70%)                                        | $\alpha$ Gal'ase | CDH (70%)              | $\beta$ Gal'ase | CMH (40%)              |
| F                           | $\beta$ Gal'ase  | D (90%)                                          | $\beta$ H'ase    | CDH (60%)              | $\beta$ Gal'ase | CMH (40%)              |
| Gangliosides:               |                  |                                                  |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>M3</sub>             | Neu'ase (A, 24h) | CDH (100%)                                       |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>M2</sub>             | Neu'ase (A, 24h) | D (90%)                                          |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>M1</sub>             | Neu'ase (A, 24h) | F (70%)                                          |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>D1a</sub>            | Neu'ase (A, 2h)  | G <sub>M1</sub> (80%) and F (20%)                |                  |                        |                 |                        |
|                             | (A, 24h)         | F (50%)                                          |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>D1b</sub>            | Neu'ase (A, 2h)  | G <sub>M1</sub> (90%) and F (10%)                |                  |                        |                 |                        |
|                             | (A, 24h)         | F (30%)                                          |                  |                        |                 |                        |
| G <sub>T1b</sub>            | Neu'ase (C, 2h)  | G <sub>M1</sub> (90%) and G <sub>D1b</sub> (10%) |                  |                        |                 |                        |
|                             | (A, 2h)          | G <sub>M1</sub> (90%) and F (10%)                |                  |                        |                 |                        |
|                             | (A, 24h)         | F (30%)                                          |                  |                        |                 |                        |

<sup>a)</sup> Products corresponding to standard glycosphingolipids on TLC.

Abbreviations:  $\beta$ H'ase,  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from jack bean (0.5 unit, Seikagaku Kogyo);  $\alpha$ Gal'ase,  $\alpha$ -galactosidase from beef kidney (0.1 unit, Boehringer Mannheim);  $\beta$ -Gal'ase,  $\beta$ -galactosidase from jack bean (0.3 unit, Seikagaku Kogyo); Neu'ase, neuraminidase; A, neuraminidase from *Arthrobacter ureafacies* (4 milli unit, Nakarai Chem. Co.); C, neuraminidase from *Clostridium perfringens* (10 milli unit, Sigma, Type VI).

Table 4 Characterization of monosaccharide derivatives from permethylated glycosphingolipids.

| Glycolipid       | *4Glc | 0Gal | *3Gal | *4Gal | *3, 4Gal | *0GalNAc | *3GalNAc | NeuAc <sup>a)</sup> | *8NeuAc <sup>b)</sup> |
|------------------|-------|------|-------|-------|----------|----------|----------|---------------------|-----------------------|
| C                | 1.00  | 0.62 | —     | 1.03  | —        | —        | —        |                     |                       |
| D                | 1.00  | —    | —     | 0.68  | —        | +        | —        |                     |                       |
| E                | 1.00  | —    | 0.20  | 0.30  | —        | 0.56     | —        |                     |                       |
| F                | 1.00  | 1.05 | —     | 0.48  | —        | —        | 0.61     |                     |                       |
| G <sub>M4</sub>  | —     | —    | +     | —     | —        | —        | —        | +                   | —                     |
| G <sub>M3</sub>  | 1.00  | —    | 0.57  | —     | —        | —        | —        | +                   | —                     |
| G <sub>M2</sub>  | 1.00  | —    | —     | —     | 0.30     | 1.26     | —        | +                   | —                     |
| G <sub>M1</sub>  | 1.00  | 1.17 | —     | —     | 1.04     | —        | 0.44     | +                   | —                     |
| G <sub>D1a</sub> | 1.00  | —    | ++    | —     | 0.23     | +        | —        |                     |                       |
| G <sub>D1b</sub> | 1.00  | 0.47 | —     | —     | ++       | —        | 0.45     | 1.00                | 1.51                  |
| G <sub>T1b</sub> | 1.00  | —    | 0.58  | —     | ++       | —        | 0.61     | 1.00                | 0.18                  |

\* Prefixed number for each monosaccharide indicates the position unsubstituted by -O-CH<sub>3</sub>. Values indicate the amounts of the individual monosaccharide derivatives relative to that of 4Glc.

<sup>a)</sup> Permethylated methyl glycoside methyl ester of N-acetylneuraminic acid (characteristic m/z: 45, 89, 129, 274, 318, 362, 376, 348).

<sup>b)</sup> 8-O-trimethylsilyl-4, 7, 9-tri-O-methyl derivative of the methyl ketoside methyl ester of N-acetylneuraminic acid (characteristic m/z: 129, 147, 201, 254, 318, 356, 406, 450). The presence of 8-unsubstituted N-acetylneuraminic acid in gangliosides G<sub>D1b</sub> and G<sub>T1b</sub> indicates that two sialic acid molecules are bound through a 2-8 linkage in the gangliosides.

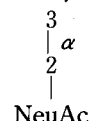
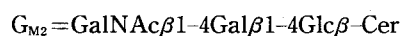
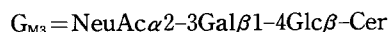
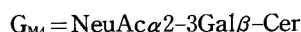
Abbreviations: —, not detected; + or ++, detected.

脂質組成上、むしろ、胎児脳のパターンに類似していた（胎児脳については、後述）。

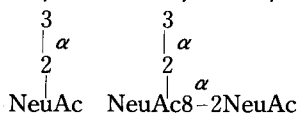
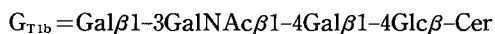
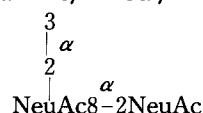
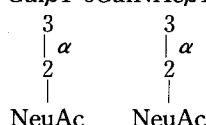
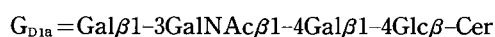
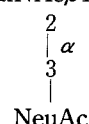
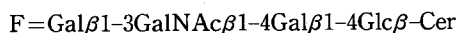
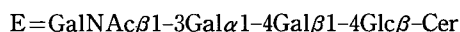
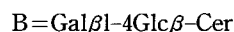
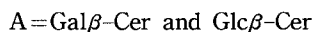
Case 2~4 では、asialo- $G_{M1}$  の顕著な蓄積を認め、また、従来報告<sup>14)</sup> のないグロボ系糖脂質の蓄積が認められた。6 か月の正常幼児脳では、globoside ( $GbOse_4$ , Cer, E) 及び微量の asialo- $G_{M1}$  を認めるが、3 歳以降の正常脳では、Galcer 及び LacCer が主な構成糖脂質であった。

ガングリオシドでは、Case 1~4 とも、 $G_{M1}$  の顕著な蓄積を示し、対照と比べて、 $G_{M3}$  及び  $G_{M2}$  の増量が認め

Gangliosides:



Neutral glycosphingolipids:



**Fig. 4** Chemical structures of glycosphingolipids from  $G_{M1}$ -gangliosidosis. The structures were confirmed with sugar composition, sequential hydrolysis of glycosphingolipid with glycosidases and methylation studies. The nomenclature of gangliosides was employed with Svennerholm.<sup>35)</sup>

Abbreviations: Cer, ceramide; Gal, galactose; Glc, glucose;

GalNAc, N-acetylgalactosamine; NeuAc, N-acetylneuraminic acid.



られ、この傾向は、早期発症例ほど著しかった。脳組織における G<sub>M1</sub> 量は、6 か月から3歳にかけて増量し、3歳以降は、400~500 nmol/g wet tissue とほぼ一定となり、経時変化が認められた。

#### 4.1.7 糖脂質の構成脂肪酸

Table 6 に、糖脂質の脂肪酸組成を示す。

ガングリオシドの構成脂肪酸は、対照及び罹患脳とも、ステアリン酸 (C<sub>18:0</sub>) が主体であり、症例、年齢間の脂肪酸組成の変動は認めなかった。GalCer 及び GlcCer を含む CMH とスルファチドにおいて、構成脂肪酸に占める C<sub>22:0</sub> 以上の長鎖脂肪酸並びに 2-hydroxy 脂肪酸 (オキシン酸) の割合は、罹患脳で低下が認められ、特に Case 1 で著しかった。対照脳において、これらの比率の加齢による増加が認められた (Fig. 5 及び Fig. 6)。

### 4.2 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis 胎児脳の糖脂質

#### 4.2.1 糖脂質の薄層クロマト・パターン

Fig. 7 に中性糖脂質画分の TLC パターンを示す。対照及び罹患胎児脳に共通して、未知の糖脂質 “X” 及び “Y” が認められた。対照胎児脳の TLC 二波長クロマト

スキャナによるクロマトグラムを Fig. 8 に示す。C, D 及び E は、各々 TLC での R<sub>f</sub> 値より、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 小児脳に認められた GbOse<sub>3</sub>Cer, GgOse<sub>3</sub>Cer, GbOse<sub>4</sub>Cer であった。未同定の “X” 及び “Y” は、Iatrobeds カラムで精製・分離し、均一であることを確めた (Fig. 9)。

Fig. 10 に、ガングリオシド画分の TLC パターンを示す。

#### 4.2.2 糖脂質 “X” 及び “Y” について

最近、糖脂質の構造決定に際し、GC-MS 分析と並んで、測定試料を破壊することなく、測定後に試料を回収できることより、<sup>1</sup>H-NMR の応用がさかんになってきた<sup>33,36)</sup>。対照胎児脳から分離・精製された未同定糖脂質 “X” 及び “Y” は、1 mg 弱と少量のため、まず構造の概要を調べる目的で <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの測定を行なった。Fig. 11 に示す (A) は、Case 2 から得られた G<sub>M1</sub> である。NeuAc, ceramide, GalNAc 由来の amide proton のシグナルが低共鳴域に認められる。次に、fatty acid, long chain base の二重結合由来のシグナルが 5.5 ppm 付近で認められ、糖鎖の C-1-H 由来

Table 5 Contents and proposed structures of brain glycosphingolipids from four cases of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis.

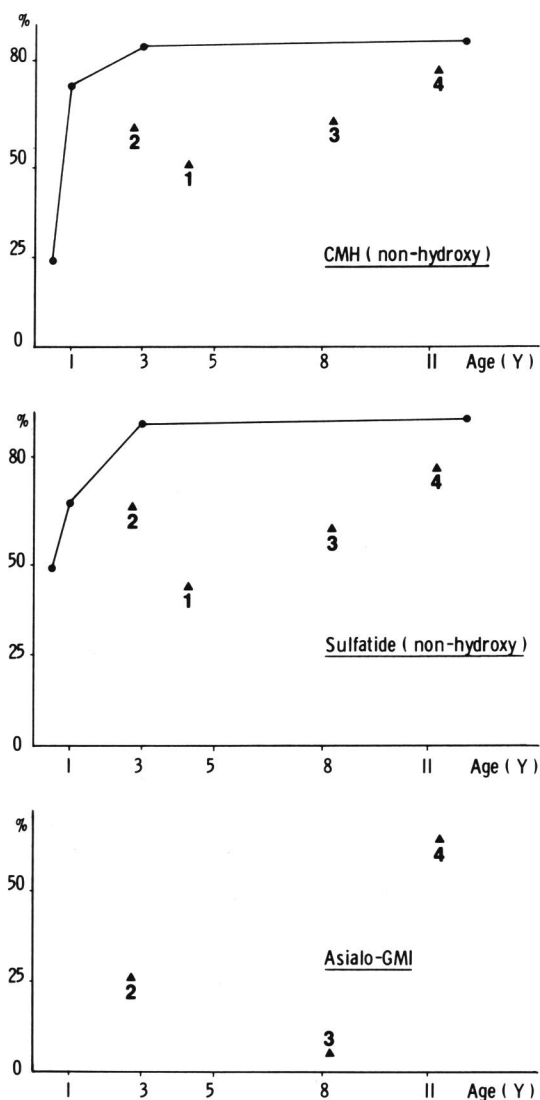
| Glycolipids on TLC                                | Proposed structure         | Case 1 | Case 2 | Case 3 | Case 4 | Control 1 (6M) | Control 2 (3Y) |
|---------------------------------------------------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|
| Neutral glycosphingolipids (nanomol/g wet tissue) |                            |        |        |        |        |                |                |
| A                                                 | GalCer & GlcCer            | 136    | 747    | 2,309  | 2,304  | 527            | 3,324          |
| B                                                 | LacCer                     | 34     | 150    | 495    | 212    | 125            | 276            |
| C                                                 | GbOse <sub>3</sub> Cer     | 8      | 208    | 122    | 116    | n. d.          | n. d.          |
| D                                                 | GgOse <sub>3</sub> Cer     | 10     | 108    | 177    | 58     | n. d.          | n. d.          |
| E                                                 | GbOse <sub>4</sub> Cer     | n. d.  | 100    | 102    | 145    | 106            | n. d.          |
| F                                                 | GgOse <sub>4</sub> Cer     | n. d.  | 826    | 598    | 325    | tr             | n. d.          |
| “X”                                               | nLcOse <sub>4</sub> Cer    | 12     | n. d.  | n. d.  | n. d.  | n. d.          | n. d.          |
| “Y”                                               | FucnLcOse <sub>5</sub> Cer | 11     | n. d.  | n. d.  | n. d.  | n. d.          | n. d.          |
| Gangliosides (nanomol/g wet tissue)               |                            |        |        |        |        |                |                |
| G <sub>M4</sub>                                   |                            | n. d.  | n. d.  | n. d.  | 3      | n. d.          | 11             |
| G <sub>M3</sub>                                   |                            | 823    | 681    | 412    | 397    | 14             | 42             |
| G <sub>M2</sub>                                   |                            | 607    | 476    | 353    | 217    | 48             | 92             |
| G <sub>M1</sub>                                   |                            | 6,421  | 4,031  | 2,627  | 1,616  | 193            | 406            |
| G <sub>D1a</sub>                                  |                            | 140    | 29     | 300    | 238    | 156            | 328            |
| G <sub>D1b</sub>                                  |                            | 333    | 250    | 207    | 93     | 26             | 26             |
| G <sub>T1b</sub>                                  |                            | 266    | 41     | 93     | 30     | 17             | 60             |
| G <sub>Q</sub>                                    |                            | 20     | 12     | 12     | 3      | 1              | 6              |

Proposed structures were confirmed with sugar composition, enzymatic hydrolysis and methylation studies. “X” and “Y” were corresponding to unknown glycosphingolipids detected in fetal brain on TLC, which were partially analyzed with <sup>1</sup>H-NMR. Abbreviations: n. d., not detected; tr, trace.

Table 6 Fatty acid composition of brain glycosphingolipids from four cases of  $G_{M1}$ -gangliosidosis.

| Glycolipids            |      | (% of total fatty acids) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------------|------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                        |      | 16:1                     | 16:0 | 18:1 | 18:0 | 20:0 | 22:1 | 22:0 | 23:1 | 23:0 | 24:1 | 24:0 | 25:1 | 25:0 | 26:1 | 26:0 |
| Case 1                 |      |                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| GalCer & GlcCer        | N100 | —                        | tr   | 8    | 25   | 4    | —    | —    | —    | 2    | 10   | 19   | 16   | 6    | 6    | 4    |
| Sulfatide              | N100 | —                        | 3    | 6    | 24   | 7    | —    | —    | —    | 4    | 13   | 22   | 5    | 5    | 5    | 6    |
| G <sub>M1</sub>        | N100 | —                        | 7    | 1    | 77   | 9    | 1    | 2    | —    | —    | 2    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| Case 2                 |      |                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| GalCer & GlcCer        | N 82 | —                        | 2    | —    | 32   | 5    | —    | 9    | —    | 6    | 8    | 29   | 2    | 4    | 1    | 2    |
|                        | H 18 | —                        | —    | —    | 1    | tr   | —    | 11   | —    | 14   | —    | 65   | —    | 6    | —    | 3    |
| LacCer                 | N 90 | —                        | 4    | —    | 59   | 9    | —    | 11   | —    | 3    | 3    | 11   | —    | tr   | —    | —    |
|                        | H 10 | —                        | —    | —    | —    | —    | —    | 30   | —    | 1    | —    | 64   | —    | —    | —    | —    |
| GbOse <sub>3</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 47   | 8    | —    | 22   | —    | —    | —    | 18   | —    | —    | —    | —    |
| GgOse <sub>3</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 46   | 11   | —    | 22   | —    | —    | —    | 21   | —    | —    | —    | —    |
| GbOse <sub>4</sub> Cer | N100 | —                        | 11   | —    | 45   | 5    | —    | 26   | —    | 2    | 3    | 8    | —    | —    | —    | —    |
| GgOse <sub>4</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 62   | 12   | —    | 20   | —    | —    | —    | 6    | —    | —    | —    | —    |
| Sulfatide              | N 88 | —                        | 4    | —    | 28   | 2    | —    | 6    | —    | 7    | —    | 35   | —    | 14   | 4    | —    |
|                        | H 12 | —                        | —    | —    | 7    | 1    | —    | 17   | —    | 10   | —    | 62   | —    | 3    | —    | tr   |
| G <sub>M3</sub>        | N100 | —                        | 7    | —    | 74   | 3    | —    | 1    | —    | 11   | —    | 4    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>M2</sub>        | N100 | —                        | 2    | 10   | 74   | 7    | —    | 3    | —    | —    | —    | 4    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>M1</sub>        | N100 | —                        | 1    | 5    | 81   | 9    | —    | 3    | —    | tr   | —    | 1    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>D1a</sub>       | N100 | —                        | 13   | 10   | 59   | 8    | —    | 3    | —    | —    | —    | 4    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>D1b</sub>       | N100 | —                        | 15   | 1    | 71   | 6    | —    | 2    | —    | —    | —    | 5    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>T1b</sub>       | N100 | —                        | 5    | tr   | 57   | 6    | —    | 8    | —    | 7    | —    | 17   | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>Q</sub>         | N100 | —                        | 20   | 2    | 68   | 10   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| Case 3                 |      |                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| GalCer & GlcCer        | N 90 | —                        | 10   | 6    | 29   | 4    | —    | 4    | —    | 3    | 11   | 13   | 9    | 4    | 5    | 2    |
|                        | H 10 | —                        | —    | —    | tr   | —    | —    | —    | 7    | 14   | 9    | 42   | 3    | 12   | 8    | 5    |
| GgOse <sub>4</sub> Cer | N100 | 1                        | 9    | 3    | 73   | 10   | 1    | 1    | —    | tr   | tr   | 1    | —    | —    | —    | —    |
| Sulfatide              | N 56 | 2                        | 17   | 13   | 22   | 2    | —    | —    | —    | 2    | 12   | 11   | 6    | 4    | 7    | 2    |
|                        | H 44 | —                        | —    | —    | 5    | 1    | —    | 6    | —    | 14   | 9    | 42   | 1    | 10   | 8    | 4    |
| G <sub>M1</sub>        | N100 | —                        | 4    | 1    | 79   | 14   | tr   | 2    | —    | —    | tr   | tr   | —    | —    | —    | —    |
| Case 4                 |      |                          |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| GalCer & GlcCer        | N 50 | —                        | 2    | —    | 19   | 2    | —    | 5    | —    | 7    | 14   | 29   | 5    | 10   | 6    | 1    |
|                        | H 50 | —                        | —    | —    | 1    | tr   | —    | 8    | —    | 20   | —    | 50   | —    | 14   | —    | 6    |
| LacCer                 | N 75 | —                        | —    | —    | 15   | 12   | —    | 38   | —    | 5    | —    | 23   | —    | 7    | —    | —    |
|                        | H 25 | —                        | —    | —    | 4    | tr   | —    | 11   | —    | 22   | —    | 63   | —    | —    | —    | —    |
| GbOse <sub>3</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 16   | 7    | —    | 60   | —    | 3    | —    | 14   | —    | —    | —    | —    |
| GgOse <sub>3</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 22   | 5    | —    | 38   | —    | 8    | 10   | 17   | —    | —    | —    | —    |
| GbOse <sub>4</sub> Cer | N100 | —                        | —    | —    | 39   | —    | —    | 52   | —    | 3    | —    | 6    | —    | —    | —    | —    |
| GgOse <sub>4</sub> Cer | N100 | —                        | 3    | —    | 19   | 14   | —    | 37   | —    | 5    | —    | 22   | —    | —    | —    | —    |
| Sulfatide              | N 43 | —                        | 10   | —    | 15   | 1    | —    | 4    | —    | 9    | 2    | 37   | 2    | 14   | 1    | 5    |
|                        | H 57 | —                        | —    | —    | 1    | tr   | —    | 8    | —    | 14   | —    | 62   | —    | 13   | —    | 2    |
| G <sub>M4</sub>        | N 70 | —                        | 33   | 25   | 39   | 3    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
|                        | H 30 | —                        | —    | —    | 5    | 1    | —    | 94   | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>M3</sub>        | N100 | —                        | 8    | tr   | 83   | 3    | —    | 1    | —    | 1    | 1    | 1    | 2    | —    | —    | —    |
| G <sub>M2</sub>        | N100 | —                        | 4    | —    | 72   | 3    | 10   | 4    | —    | 1    | 2    | 2    | 1    | 1    | tr   | tr   |
| G <sub>M1</sub>        | N100 | —                        | 1    | —    | 75   | 13   | 4    | 2    | —    | —    | tr   | 1    | 4    | —    | —    | —    |
| G <sub>D1a</sub>       | N100 | —                        | tr   | —    | 93   | 2    | 1    | tr   | —    | 1    | —    | 1    | —    | 2    | —    | —    |
| G <sub>D1b</sub>       | N100 | —                        | 6    | —    | 68   | 11   | 2    | 5    | —    | 2    | —    | 4    | —    | 2    | —    | —    |
| G <sub>T1b</sub>       | N100 | —                        | 2    | —    | 56   | 15   | 8    | 7    | —    | 3    | —    | 9    | —    | —    | —    | —    |
| G <sub>Q</sub>         | N100 | —                        | 19   | 1    | 76   | 4    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |

Abbreviations: N, non-hydroxy fatty acids; H, 2-hydroxy fatty acids; —, not detected; tr, trace (less than 1%).

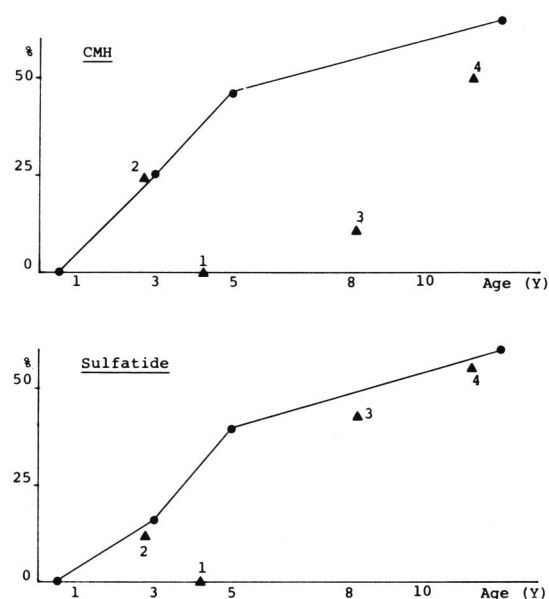


**Fig. 5** Percentage of long-chain fatty acids (longer than C<sub>20</sub>).

● : normal controls  
▲ : patients (Case 1-Case 4).

Percentage

$$= \frac{\text{Peak area of fatty acids longer than } C_{22:0}}{\text{Peak area of total fatty acids}}$$



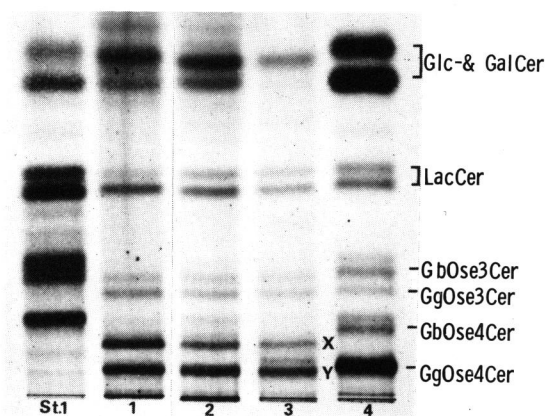
**Fig. 6** Percentage of 2-hydroxy fatty acids in CMH and Sulfatide.

● : normal controls

▲ : patients (Case 1-Case 4).

Percentage

$$= \frac{\text{Peak area of total 2-hydroxy fatty acids}}{\text{Peak area of total fatty acids}}$$



**Fig. 7** Thin-layer chromatogram of neutral glycosphingolipid fractions from fetal G<sub>M1</sub>-gangliosidosis brains. St1, standard mixture (CMH, CDH, CTH, globoside); 1, control fetuses (22-23 weeks); 2, type 1 fetus (23 weeks); 3, type 2 fetus (24 weeks); 4, type 1 infant (Case 2).

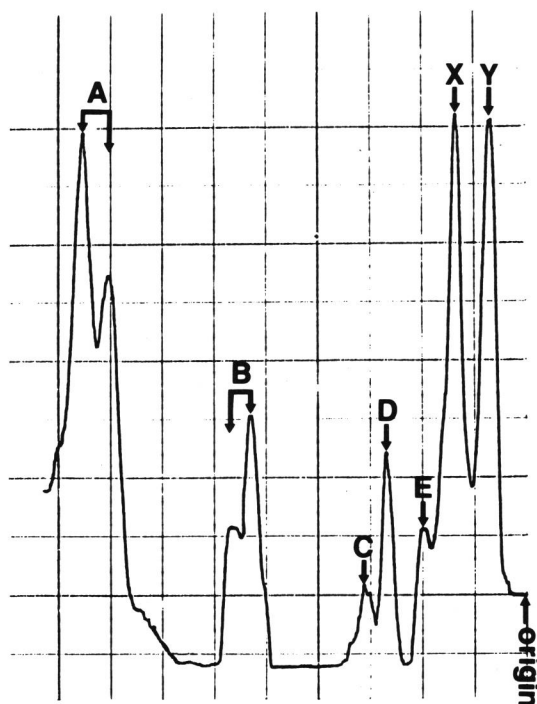


Fig. 8 Chromatogram of TLC-dual wavelength chromatoscanner in neutral glycosphingolipid fraction. "X" and "Y" indicate unknown glycosphingolipids. The details are described in text.

の anomeric proton は、4~5 ppm の狭い範囲で認められる。糖鎖の anomeric C-1-H 以外のシグナルが重なり合う時は、D<sub>2</sub>O を加えて測定した。NeuAc, N-acetylhexosamine の N-acetyl 基由来の methyl proton のシグナルは、7~8 ppm の高共鳴域で認められる。共鳴ピークの強度と位置を調べるにより、<sup>1</sup>H-NMR では、糖の組成及びモル比、アノマーを知ることができる。Fig. 11 の(B)は "X" の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルであるが、糖組成は、Glc : Gal : GlcNAc = 1 : 2 : 1 であり、これらはすべて β 結合していた。solvent I 系での TLC の既知の R<sub>f</sub> 値と比較して、糖脂質 "X" は、paragloboside (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcCer) と考えられた。"Y" は、(C) が示すごとく、"X" の他に α-fucose (Fuc), β-GlcNAc の anomeric proton が認められ、糖組成は、Glc : Gal : GlcNAc : Fuc = 1 : 2 : 2 : 1 であり、"X" にさらに、β-GlcNAc と α-fucose が結合した fucosylated glycosphingolipid (GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-<sup>α</sup>Fuc

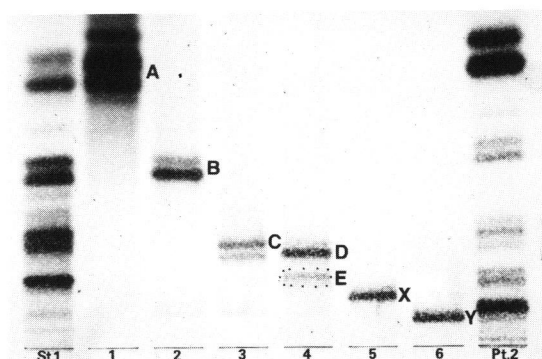


Fig. 9 Thin-layer chromatogram of isolated neutral glycosphingolipids from control fetal brains. St1, standard mixture (CMH, CDH, CTH, globoside); 1-6, fractionated neutral glycosphingolipids; Pt2, neutral glycosphingolipid fraction from type 1 infant (Case 2).

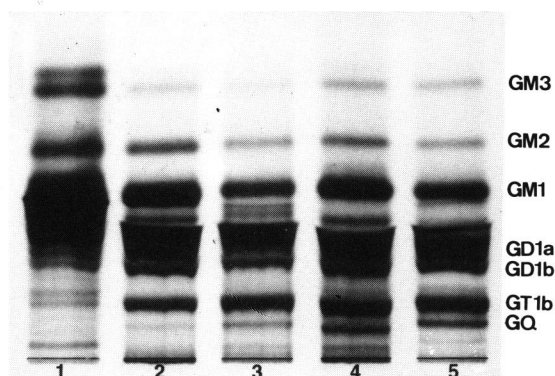
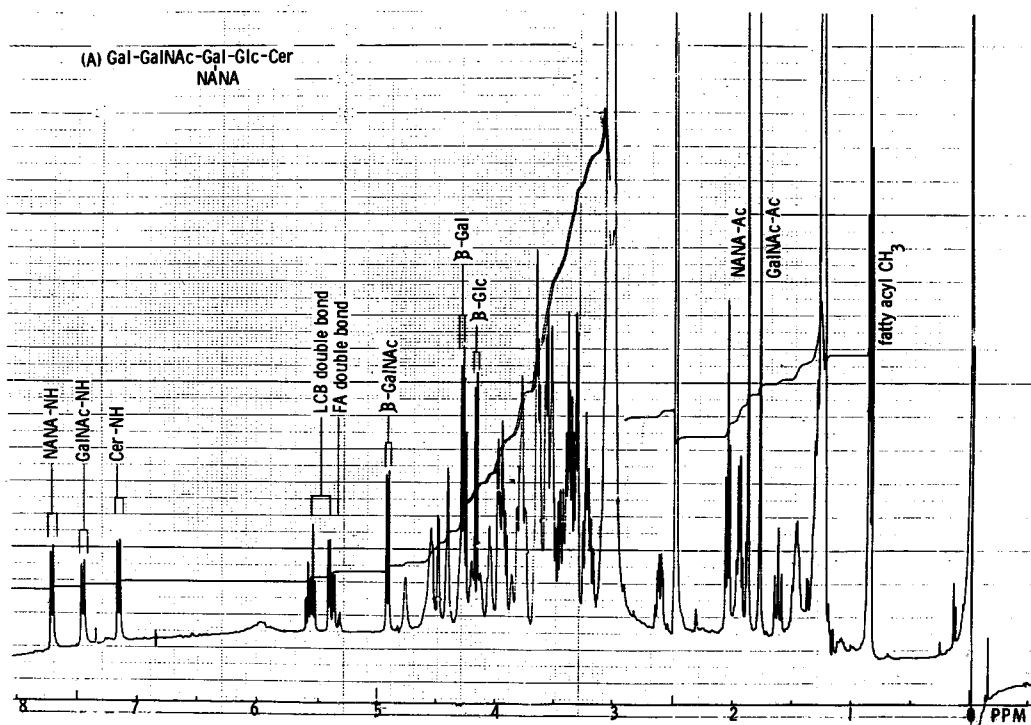
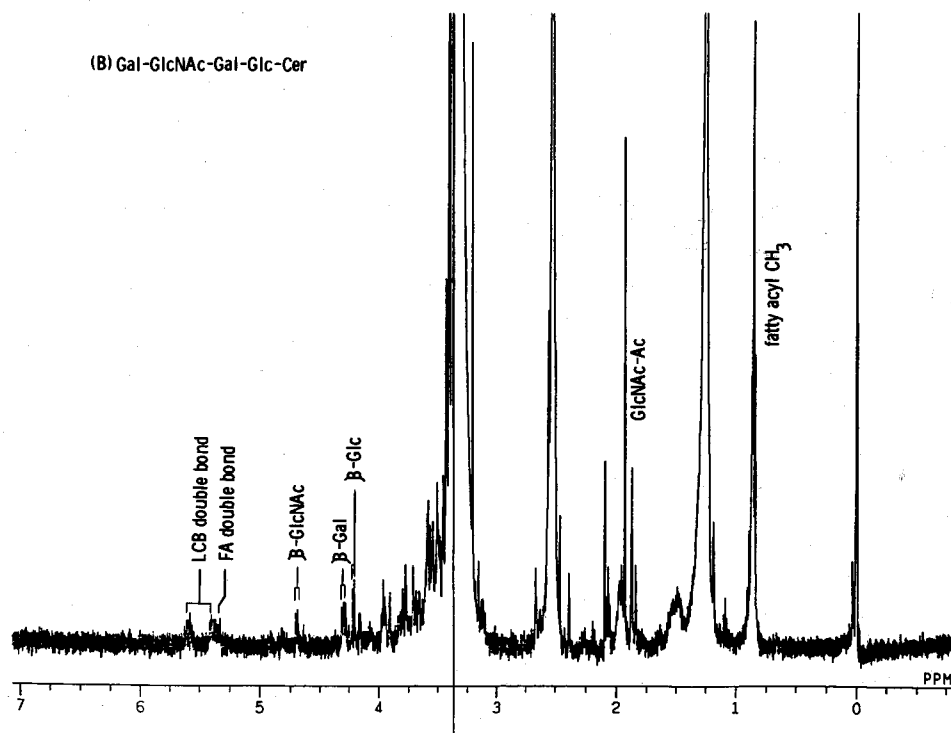


Fig. 10 Thin-layer chromatogram of gangliosides from fetal GM<sub>1</sub>-gangliosidosis brains. 1, type 1 infant (Case 2); 2, control infant (6 months); 3, control fetuses (22-23 weeks); 4, type 1 fetus (23 weeks); 5, type 2 fetus (24 weeks).

-4GlcCer) であることが推定された。

#### 4・2・3 糖脂質の組成及び含量

Table 7 に、中性糖脂質の組成及び含量を示す。中性糖脂質画分では、対照と罹患胎児脳で、明らかな違いは認めなかった。小児脳に比べ、胎児脳の中性糖脂質含量はヘキソース量として約 1/10 と著しく少なかったが、Table 7 に示すごとく、グロブ系、ガングリオ系、ネオラクト系列のいずれも合成されており、糖脂質代謝上は、活発であることが示唆された。一方、ガン

Fig. 11 (A), G<sub>M1</sub>-ganglioside in Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>;Fig. 11 (B), "X" in D<sub>2</sub>O-Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>;

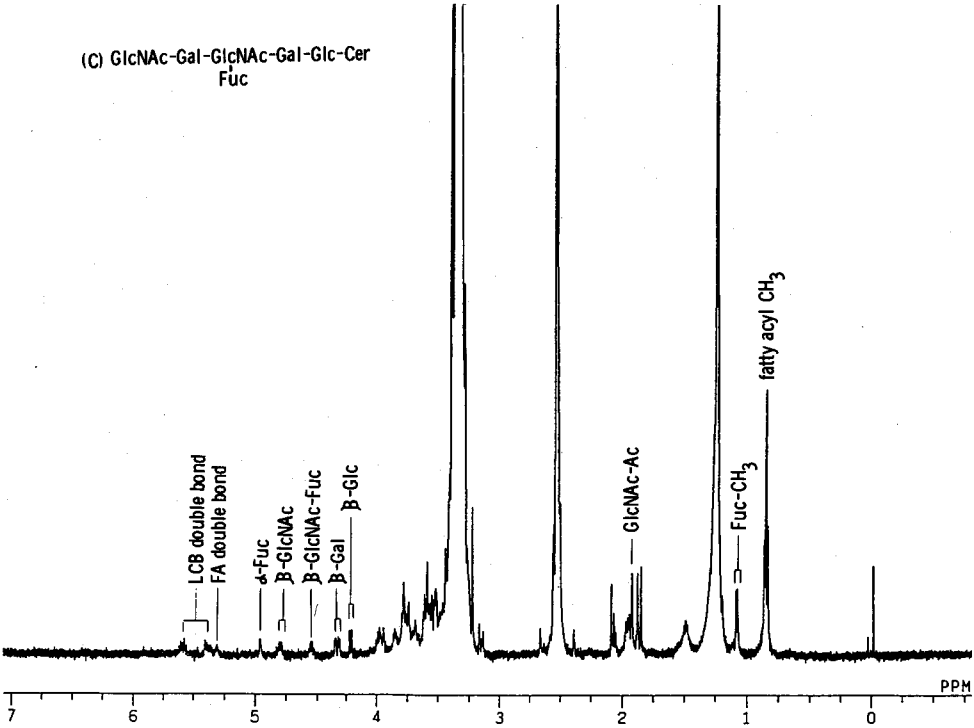


Fig. 11 (C), “Y” in D<sub>2</sub>O-Me<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>.

Fig. 11 Proton NMR spectra of G<sub>M1</sub>-ganglioside, “X” and “Y”.  
The proposed structures were assigned in figures. The details are described in text.

Table 7 Contents and proposed structures of neutral glycosphingolipids from fetal G<sub>M1</sub>-gangliosidosis brains.

| Glycolipids<br>on TLC | Proposed structure         | Control fetus<br>(22-23W, n=5) | Type 1 fetus<br>(23W) | Type 2 fetus<br>(24W) |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| A                     | GalCer & GlcCer            | 26                             | 31                    | 23                    |
| B                     | LacCer                     | 19                             | 17                    | 15                    |
| C                     | GbOse <sub>3</sub> Cer     | 5                              | 3                     | 2                     |
| D                     | GgOse <sub>3</sub> Cer     | 10                             | 8                     | 18                    |
| E                     | GbOse <sub>4</sub> Cer     | tr                             | 2                     | n. d.                 |
| “X”                   | nLcOse <sub>4</sub> Cer    | 21                             | 18                    | 22                    |
| “Y”                   | FucnLcOse <sub>3</sub> Cer | 19                             | 21                    | 20                    |
| (Contents %)          |                            |                                |                       |                       |
| Total hexose          | (μg/g wet tissue)          | 43                             | 54                    | 45                    |

Abbreviations: n. d., not detected; tr, trace.

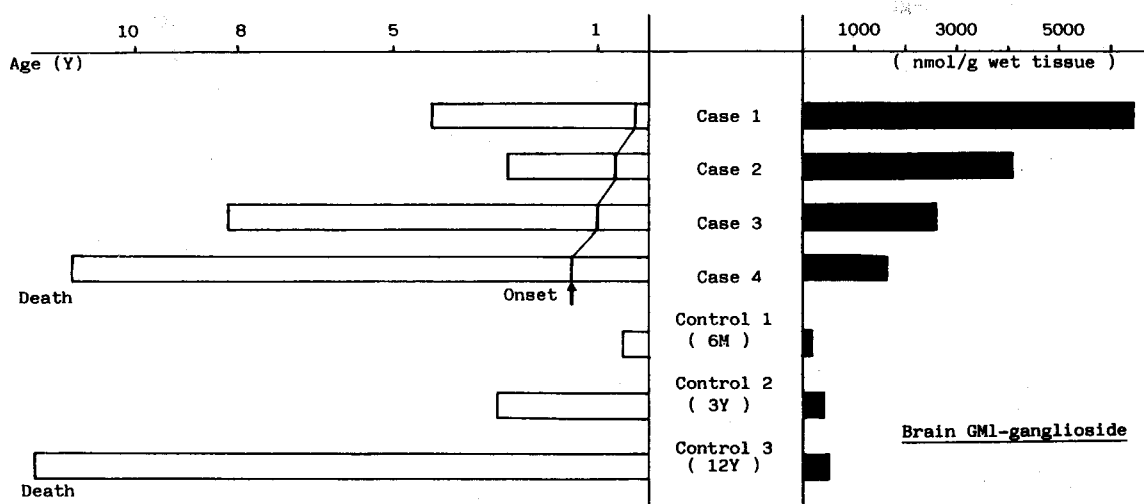
リオンド画分では、対照胎児脳に比べ、総シアル酸量において、type 1 fetusで、2.9倍、type 2 fetusで、1.5倍の増加を認め、G<sub>M1</sub>量ではtype 1 fetusで、4.3

倍、type 2 fetusで1.6倍と、type 1 fetusでの総シアル酸、G<sub>M1</sub>の増量が著しかった。(Table 8).

**Table 8** Contents and molar ratios to G<sub>D18</sub>-ganglioside (=100) of gangliosides in fetal G<sub>M1</sub>-gangliosidosis brains.

| Gangliosides                         | Control fetus<br>(22-23W, n=5) | Type 1 fetus<br>(23W)      | Type 2 fetus<br>(24W)      |
|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Molar ratios (G <sub>D18</sub> =100) |                                |                            |                            |
| G <sub>M3</sub>                      | 3                              | 7                          | 4                          |
| G <sub>M2</sub>                      | 25                             | 20                         | 14                         |
| G <sub>M1</sub>                      | 98<br>(180) <sup>a)</sup>      | 149<br>(767) <sup>a)</sup> | 105<br>(288) <sup>a)</sup> |
| Total NeuAc $\mu$ g/g wet tissue     | 272                            | 781                        | 406                        |

<sup>a)</sup> brain G<sub>M1</sub>-ganglioside nanomol/g wet tissue.

**Fig. 12** Life span and the accumulation of brain G<sub>M1</sub>-ganglioside.

## 5 考 察

### 5・1 G<sub>M1</sub>-Ganglioside の蓄積について

G<sub>M1</sub>-gangliosidosis は、現在、臨床的に type 1 及び type 2 に分類され<sup>6)</sup>、さらに、成人型の報告<sup>10-12)</sup>もなされている。脳組織における G<sub>M1</sub> の蓄積については、type 1, 2 とも灰白質ガングリオンドの 70% 以上が G<sub>M1</sub> であるとの報告<sup>37)</sup>もあるが、type 1 及び 2 の G<sub>M1</sub> の蓄積について検討したのは、Suzuki *et al.*<sup>38)</sup> の報告があるのみで、未だにはっきりしていない。

Suzuki *et al.*<sup>38)</sup> の報告では、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の表現型と type の蓄積の程度とは必ずしも相関しない症例もあることが指摘されている。しかし、著者が分析した 4 症例において、G<sub>M1</sub> の蓄積の程度に一定の傾向が認められた。つまり、脳ガングリオンドに占める G<sub>M1</sub> の

割合は、type 1 である Case 1 及び Case 2 では、各々 75%、73% と 70% 以上であるのに対し、type 2 である Case 3 及び 4 では、各々、66% 及び 62% と若干低い比率を示した。さらに、Fig. 12 に示すごとく、早期に発症した症例ほど、G<sub>M1</sub> の蓄積が著しく、life span から求められた G<sub>M1</sub> の蓄積の速度 (brain-G<sub>M1</sub> nanomol/g wet tissue/year) は、Table 9 に示すごとく、Case 1 = Case 2 > Case 3 > Case 4 の順であり、両 type 間で明らかに異なっていた。Suzuki *et al.*<sup>38)</sup> の検討した症例で一定の傾向が認められなかった原因には、著者の症例と比べて全体にその life span が短く、特に、type 1 群では短いことから、報告当時の医療水準による差が影響していると考えられた。従って、type 1 群では、G<sub>M1</sub> の蓄積が顕著になる以前に死亡してしまう症例もあったことが推察された。

**Table 9** The accumulation rate of  $G_{M1}$ -ganglioside in the affected brains with  $G_{M1}$ -gangliosidosis.

| Clinical type | nanomol/g wet tissue/year <sup>a)</sup> |
|---------------|-----------------------------------------|
| Type 1        |                                         |
| Case 1        | 1661                                    |
| Case 2        | 1706                                    |
| Type 2        |                                         |
| Case 3        | 314                                     |
| Case 4        | 133                                     |

<sup>a)</sup> The accumulation rate

$$= \frac{\text{The amount of } G_{M1}\text{-ganglioside at death} - 193^b)}{\text{Age at death (year)} - 0.5}$$

<sup>b)</sup> The amount of  $G_{M1}$ -ganglioside in control brain at 6 months.

現在, amniocentesis による本症の出生前診断が可能である<sup>39,41)</sup>。しかし, 剖検罹患胎児脳の脂質分析に関する報告は, 文献的に散見するのみである<sup>39-42)</sup>。本症 type 1 の患者での出生前診断で得られた罹患胎児脳を分析した Kaback *et al.*<sup>39)</sup>, Lowden *et al.*<sup>40)</sup> の報告では, ガングリオシド画分での総シアル酸は正常範囲で,  $G_{M1}$  の占める割合が, 対照の 1.6~2.0 倍であったと述べている。胎児期より  $G_{M2}$  の顕著な蓄積を示す Tay-Sachs 病<sup>43)</sup> と異なり,  $G_{M1}$ -gangliosidosis 罹患胎児では, 胎児期での蓄積は軽度であるとの報告が多い<sup>39-42)</sup>。しかし, 著者が分析した type 1 fetus では, 対照と比べ, 総シアル酸で 2.9 倍,  $G_{M1}$  量で 4.3 倍と, 従来の報告<sup>39-42)</sup> と異なり,  $G_{M1}$  の蓄積が著しく, 興味ある結果となった。この type 1 fetus は, Case 1 の出生前診断より得られた胎児であることより, Case 1 は, 胎児期からすでに  $G_{M1}$  の蓄積をきたしていた可能性がある。一方, 軽度の  $G_{M1}$  の増加しか示さなかった type 2 fetus をもつ Case 3 は, 胎児期以後, 年齢とともに  $G_{M1}$  が蓄積したことが推察された。

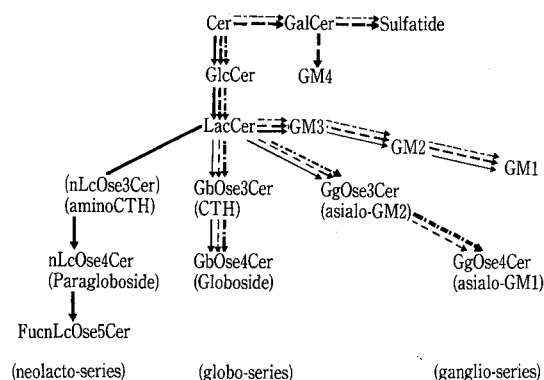
## 5.2 $G_{M1}$ -Gangliosidosis 小児脳における中性糖脂質の異常について

$G_{M1}$ -gangliosidosis の脂質分析は, 従来, 脳ガングリオシドに関する報告例が<sup>2-6,13,37)</sup> 大部分であり, 脳中性糖脂質に関したものは, Suzuki and Chen<sup>14)</sup> の報告のみである。著者は, 中性糖脂質を詳細に分析し検討した。

著者の分析した 4 症例のうち, Case 2, 3, 4 において, Table 5 に示すごとく, asialo- $G_{M2}$  (=GgOse<sub>3</sub>Cer), asialo- $G_{M1}$  (=GgOse<sub>4</sub>Cer) と並んで, CTH (=GbOse<sub>3</sub>Cer), globoside (=GbOse<sub>4</sub>Cer) の蓄積が認め

られた。後者は, 主に, 肝<sup>44)</sup>・腎<sup>45)</sup> などの実質臓器に多く存在し, 成人脳では全く検出されない。Vanier *et al.*<sup>46)</sup> は, 幼児脳 (2~24 months) を分析し, 微量ではあるが ceramide tetrahexoside である globoside, asialo- $G_{M1}$  の存在することを報告している。著者も, 6 か月の対照幼児脳において, globoside, asialo- $G_{M1}$  を確認し, また, 対照胎児脳でも, CTH, globoside などグロボ系糖脂質の存在を確認した。従って, これらグロボ系糖脂質は, 胎児期及び乳児早期に存在し, 脳の発達に伴ってその代謝経路は不活化されるものと考えられた。以上より,  $G_{M1}$ -gangliosidosis 小児脳にみられたグロボ系糖脂質の蓄積を考えると, Fig. 13 に示すごとく,  $G_{M1}$  の顕著な蓄積のため, LacCer から  $G_{M1}$  への代謝経路は抑制され, LacCer は, グロボ系 (CTH, globoside) 及びガングリオ系 (asialo- $G_{M2}$ , asialo- $G_{M1}$ ) の系列へ代謝された可能性が推察された。

Case 1 では, asialo- $G_{M1}$  の蓄積を認めず, 糖脂質の組成は, 胎児脳と類似していた。出生前診断された type 1 fetus の結果より, Case 1 では胎児期から  $G_{M1}$  の蓄積がなされていたことが示唆され, LacCer は, 胎児期の代謝経路であるネオラクト系, グロボ系へ代謝され, 脳での糖脂質代謝上, 未分化な段階であることが示唆された。さらに, 胎児脳で asialo- $G_{M1}$  を認めないことより, 胎児期ではガングリオ系の代謝は, asialo- $G_{M2}$  で停止しており, このため, asialo- $G_{M1}$  の蓄積を

**Fig. 13** Proposed pathways for neutral glycosphingolipids synthesis in human brain.

—: main pathway in fetal period.

- - - - -: main pathway in infancy.

.....: main pathway in infancy affected by  $G_{M1}$ -gangliosidosis.



きたさなかつたものと考えられた。

Case 2, 3 及び 4 において, asialo-G<sub>M1</sub> の顕著な蓄積を認め, G<sub>M1</sub> の蓄積量と相関している様に考えられた。しかし, ヒト脳では, G<sub>M1</sub> から asialo-G<sub>M1</sub> へ転換するシアリダーゼの報告はなく, 著者の *in vitro* の実験系でも, G<sub>M1</sub> は 70% しか加水分解されなかった。G<sub>M1</sub> のように, シアル酸が還元末端から 2 番目のガラクトースに結合しアミノ糖が隣接している場合, シアリダーゼは立体障害により, このガラクトースに結合したシアル酸に作用しない<sup>47,48</sup>。この場合, タウロデオキシコール酸などの胆汁酸の共存により, 作用が可能となる。従って, G<sub>M1</sub> から asialo-G<sub>M1</sub> への経路は考えられず, asialo-G<sub>M1</sub> は, LacCer よりガングリオ系の経路をへて合成されたものと考えられる。また, G<sub>M1</sub>- $\beta$ -galactosidase は, 一部, asialo-G<sub>M1</sub> と基質親和性を有する<sup>49</sup> ため, この欠損は, asialo-G<sub>M1</sub> の顕著な蓄積を招くものと考えられた。最近, Hirabayashi *et al.*<sup>50</sup>, Matsu-moto and Taki<sup>51</sup> は, rat ascites hepatoma cells において, 通常の G<sub>M1</sub> と異なり, シアル酸が非還元末端のガラクトースに結合した G<sub>M1b</sub> (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc-Cer) を見出した。この場合, シアル酸は胆汁酸の共存なしにシアリダーゼにより容易に加水分解されるという<sup>51</sup>。しかし, 著者の行なった G<sub>M1</sub> のメチル化分析では, この G<sub>M1b</sub> の存在は確認されず, G<sub>M1b</sub> から asialo-G<sub>M1</sub> への経路は, 否定的であった。

### 5.3 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis 小児脳でのミエリン糖脂質とその構成脂肪酸について

GalCer, スルファチド, G<sub>M4</sub> などガラクト糖脂質は, ミエリンに多く存在している<sup>20,52</sup>。特に, GalCer はミエリネーションに伴って増量することが知られている<sup>53</sup>。従って, これらの糖脂質の増減は, 脳 (特に白質) でのミエリネーションの程度や脱髄の度を反映していると言える。対照脳でのこれらの糖脂質の経時的変化をみると, 胎児期より生後 3 歳まで, GalCer, スルファチドの著しい増量が認められ, また, 胎児期及び生後 6 か月の脳では, G<sub>M4</sub> は検出されず, G<sub>M4</sub> は生後 3 歳以降の脳で確認された。G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 小児脳では, GalCer, スルファチドは, 各症例とも正常対照脳と比べてその含量が低く, また, G<sub>M4</sub> は Case 1~3 では検出されなかった。従って, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis では, G<sub>M1</sub> の著明な蓄積により, 二次的に脱髄が生じていることが示唆された。しかし, これらのガラクト糖脂質は, 各症例により差が認められ, 発症時期の遅い Case 4 では, これらの変化は軽度であった。従って, Case 1, 2 の様

に, 乳児早期のミエリネーションの完成する以前に発症した症例では, ミエリネーションそのものが不充分である可能性もある。加えて, G<sub>M1</sub> の顕著な蓄積によるミエリンの二次的な崩壊により, これらガラクト糖脂質の減少は著しいものとなることが考えられた。

一方, GalCer, スルファチドの構成脂肪酸は, 年齢とともに変化することが知られている。Svennerholm and Stållberg-Stenhagen<sup>54</sup> によると, 脂肪酸の鎖長延長による長鎖脂肪酸の増加及び hydroxylation によるオキシ酸の増加が経時的に認められると報告している。著者の実験結果より, これらの糖脂質構成脂肪酸での鎖長延長及び hydroxylation の低下が認められ, 特に Case 1 で著しく, 脳の発育の程度が, これらの結果に反映されているものと考えられた。

### 5.4 G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis の臨床型と生化学所見との相関について

従来, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の臨床型と生化学的所見を対比する試みは, 主に, 酵素学的な観点からなされることが多かった。 $\beta$ -galactosidase の等電点分画, ゲル電気泳動及び Sephadex G 200 のゲルろ過による isoenzyme 分析など<sup>55</sup> の報告があるが, 現在のところ, 臨床と生化学データとの一致をみていない。また, 当教室の菊地<sup>56</sup> も,  $\beta$ -galactosidase の欠損の程度と G<sub>M1</sub> の蓄積の程度は, 必ずしも相関しないと述べている。一方, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis における G<sub>M1</sub> も含めた脳糖脂質の詳細な検索は, 現在まであまりなされていなかったのが, 実状である。G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 小児脳の分析結果から, G<sub>M1</sub> の蓄積量及びその蓄積の速度, 中性糖脂質の異常, ミエリン糖脂質及びその構成脂肪酸を検討することにより, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の type 1 と type 2 の生化学的な鑑別は可能であることが示唆された。臨床的に, type 1 とされた Case 1 及び 2 は, 出生前より G<sub>M1</sub> の蓄積を示し, G<sub>M1</sub> の蓄積速度も急速である。また, このため, 2 次的に, ミエリン糖脂質の減少や, これらの糖脂質では, 未分化な脂肪酸組成を示す。Type 2 とされた Case 3 及び 4 では, G<sub>M1</sub> の蓄積速度はより緩徐である。従って, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の臨床型を左右する因子には, G<sub>M1</sub> の蓄積速度が最も関与していると考えられた。

Suzuki *et al.*<sup>57</sup> は, 培養皮膚線維芽細胞へ <sup>14</sup>C-galactose を取り込ませ, G<sub>M1</sub>-gangliosidosis の type 間での G<sub>M1</sub>-intake の違いにより, type 1, type 2 及び adult type を生化学的に区別した。このように, G<sub>M1</sub> の蓄積を考える場合, G<sub>M1</sub> の分解系のみでなく, その合成系の研究も必要であることが, 本実験より強く示唆された。

## 6 結 語

G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 4 症例(2 例の type 1 及び 2 例の type 2) 及び罹患胎児 2 例 (type 1 及び 2) の脳糖脂質を詳細に分析し、以下の成績を得た。また、対照小児及び胎児脳の分析も行ない比較検討した。

1) G<sub>M1</sub>-gangliosidosis 小児脳の中性糖脂質では、asialo-G<sub>M1</sub> の蓄積の他、成人脳では検出されないグロボ系糖脂質(GbOse<sub>3</sub>Cer, GbOse<sub>4</sub>Cer)の蓄積を認めた。また、asialo-G<sub>M1</sub> の蓄積量は、G<sub>M1</sub> の量と相関していた。しかし、G<sub>M1</sub> の蓄積が胎児期より行なわれていたことが示唆された症例では、糖脂質のパターンは、対照胎児脳と類似しており、asialo-G<sub>M1</sub> の蓄積を認めなかった。

2) G<sub>M1</sub> の蓄積量は、早期発症例でより著しく、両 type での G<sub>M1</sub> の蓄積速度は、type 1 群の方が type 2 群より急速であった。

3) GalCer, スルファチド, G<sub>M1</sub> などガラクト糖脂質は、各症例とも対照と比べ減少しており、G<sub>M1</sub>-gangliosidosis では 2 次的な脱髄が生じていることを示唆した。また、これらの糖脂質の構成脂肪酸の鎖長延長及び hydroxylation は低下していた。

4) 罹患胎児脳での中性糖脂質組成及び含量は、対照胎児脳と比べて、明らかな差を認めなかった。罹患胎児を含めて、胎児脳では、対照小児脳も異なり、グロボ系、ガングリオ系、ネオラクト系の 3 系列の糖脂質がすべて認められた。

5) Type 1 由来の罹患胎児では、type 2 由来のものと異なり、胎児期にすでに G<sub>M1</sub> の蓄積をきたしていた。

稿を終えるにあたり、実験及び論文作製に際し、ご指導いただきました南 良二講師に深謝致します。また、GC-MS 及び <sup>1</sup>H-NMR 測定に際し、ご指導いただいた北海道大学癌研究所生化学部門、牧田 章教授に深謝致します。

なお、本論文の要旨は、第 25 回日本脂質生化学研究会(於札幌)、第 27 回日本先天代謝異常学会(於札幌)及び第 27 回日本神経化学会(於東京)で発表した。

本研究の一部は文部省総合研究(A)折居班の補助によった。

## References

1. Norman, R. M., Ulrich, H., Tingey, A. H. and Goodbody, R. A.: Tay-Sachs disease with visceral involvement and its relationship to Niemann-Pick disease. *J. Pathol. Bact.* **78**, 409-421 (1959).
2. Landing, B. H., Silverman, F. N., Craig, J. M., Jacoby, M. D., Lahey, E. and Chadwick, D. L.: Familial neurovisceral lipidosis. *Amer. J. Dis. Child.* **108**, 503-522 (1964).
3. O'Brien, J. S., Stern, M. B., Landing, B. H., O'Brien, J. K. and Donnell, G. D.: Generalized gangliosidosis. *Amer. J. Dis. Child.* **109**, 338-346 (1964).
4. Gonatas, N. K. and Gonatas, D. A. J.: Ultrastructural and biochemical observations on a case of systemic late infantile lipidosis and its relationship of Tay-Sachs disease and gargoylism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **24**, 318-340 (1965).
5. Okada, S. and O'Brien, J. S.: Generalized gangliosidosis: Beta-galactosidase deficiency. *Science* **160**, 1002-1004 (1968).
6. Derry, D. M., Fawcett, J. S., Andermann, F. and Wolfe, L. S.: Late infantile lipidosis. *Neurology (Minneapolis)* **18**, 340-347 (1968).
7. Andria, G., Giudice, E. D. and Reuser, A. J. J.: Atypical expression of  $\beta$ -galactosidase deficiency in a child with Hurler-like features but without neurological abnormalities. *Clin. Genet.* **14**, 16-23 (1978).
8. Stevenson, R. E., Taylor, H. A. and Parks, S.:  $\beta$ -galactosidase deficiency: Prolonged survival in three patients following early central nervous system deterioration. *Clin. Genet.* **13**, 305-313 (1978).
9. Taylor, H. A., Stevenson, R. E. and Parks, S. E.: Beta-galactosidase deficiency: Studies of two patients with long survival. *Amer. J. Med. Genet.* **5**, 235-245 (1980).
10. Wenger, D. A., Sattler, M., Mueller, O. T., Myers, G. G., Schneiman, R. S. and Nixon, G. W.: Adult G<sub>M1</sub> gangliosidosis: Clinical and biochemical studies on two patients and comparison to other patients called variant or adult G<sub>M1</sub> gangliosidosis. *Clin. Genet.* **17**, 323-334 (1980).
11. Goldman, J. E., Katz, D., Rapin, I., Purpura, D. P. and Suzuki, K.: Chronic G<sub>M1</sub> gangliosidosis presenting as dystonia: I. Clinical and pathological features. *Ann. Neurol.* **9**, 465-475 (1981).
12. Kobayashi, T. and Suzuki, K.: Chronic G<sub>M1</sub>-gangliosidosis presenting as dystonia: II. Biochemical studies. *Ann. Neurol.* **9**, 476-483 (1981).
13. Ledeen, R., Salaman, K., Gonatas, J. and Taghavi, A.: Structure comparison of the major mono-

- sialogangliosides from brains of normal human, gargoylism, and late infantile systemic lipidosis. Part I. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **24**, 341-346 (1965).
14. Suzuki, K. and Chen, G. C.: Brain ceramide hexosides in Tay-Sachs disease and generalized gangliosidosis (G<sub>M1</sub>-gangliosidosis). J. Lipid Res. **8**, 105-113 (1967).
15. Tsay, G. C., Dawson, G. and Li, Y. T.: Structure of the glycopeptide storage material in G<sub>M1</sub> gangliosidosis. Biochim. Biophys. Acta **385**, 305-311 (1975).
16. Wolfe, L. S., Senior, R. G. and Kin, N. M. K. N.: The structures of oligosaccharides accumulating in the liver of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis, type 1. J. Biol. Chem. **249**, 1828-1838 (1974).
17. Tsay, G. C. and Dawson, G.: Structure of the "keratosulfate-like" material in liver from a patient with G<sub>M1</sub>-gangliosidosis ( $\beta$ -D-galactosidase deficiency). Biochem. Biophys. Res. Commun. **52**, 759-766 (1973).
18. Yamashita, K., Ohkura, T., Okada, S., Yabuuchi, H. and Kobata, A.: Urinary oligosaccharides of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis: Different excretion patterns of oligosaccharides in the urine of type 1 and type 2 subgroups. J. Biol. Chem. **256**, 4789-4798 (1981).
19. Ohkura, T., Yamashita, K. and Kobata, A.: Urinary oligosaccharides of G<sub>M1</sub>-gangliosidosis: Structures of oligosaccharides excreted in the urine of type 1 but not in the urine of type 2 patients. J. Biol. Chem. **256**, 8485-8490 (1981).
20. Ledeen, R. W., Yu, R. K. and Eng, L. F.: Gangliosides of human myelin: Sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. J. Neurochem. **21**, 829-839 (1973).
21. Saito, T. and Hakomori, S.: Quantitative isolation of total glycosphingolipids from animal cells. J. Lipid Res. **12**, 257-259 (1971).
22. Ando, S., Isobe, M. and Nagai, Y.: High performance preparative column chromatography of lipids using a new porous silica, Iatrobeds. I, Separation of molecular species of sphingoglycolipids. Biochim. Biophys. Acta **424**, 98-105 (1976).
23. Momoi, T., Ando, S. and Nagai, Y.: High resolution preparative column chromatography system for gangliosides using DEAE-Sephadex and a new porous silica, Iatrobeds. Biochim. Biophys. Acta **441**, 488-497 (1976).
24. Chambers, R. E. and Clamp, J. R.: An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. Biochem. J. **125**, 1009-1018 (1971).
25. Hakomori, S.-I.: A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfanyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J. Biochem. **55**, 205-208 (1964).
26. Stellner, K., Saito, H. and Hakomori, S.-I.: Determination of aminosugar linkage in glycolipids by methylation. Arch. Biochem. Biophys. **155**, 464-472 (1973).
27. Rauvala, H. and Karkkainen, J.: Methylation analysis of neuraminic acids by gas chromatography-mass spectrometry. Carbohydr. Res. **56**, 1-9 (1977).
28. Gasa, S. and Makita, A.: Characterization of gangliosides from equine kidney and spleen. J. Biochem. **88**, 1119-1128 (1980).
29. Yoda, Y., Makita, A. and Gasa, S.: Blood-group A and the related glycolipids of human lung. J. Biochem. **91**, 627-632 (1982).
30. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. R., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. **28**, 350-356 (1956).
31. Blix, G.: The determination of hexosamine according to Elson and Morgan. Acta Chem. Scand. **2**, 467-473 (1948).
32. Suzuki, K.: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. Life Sci. **3**, 1227-1233 (1964).
33. Gasa, S., Mitsuyama, T. and Makita, A.: Proton nuclear magnetic resonance of neutral and acidic glycosphingolipids. J. Lipid Res. **24**, 174-182 (1983).
34. Hakomori, S.-I., Nudelman, E., Levery, S. B. and Kannagi, R.: Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. J. Biol. Chem. **259**, 4672-4680 (1984).
35. Svennerholm, L.: Chromatographic separation of human brain gangliosides. J. Neurochem. **10**, 58-64 (1963).
36. Dabrowski, J., Hanfland, P. and Egge, H.: Structural analysis of glycosphingolipids by high-resolution <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry **19**, 5652-5658 (1980).
37. Suzuki, K., Suzuki, K. and Chen, G. C.: Morphological, histochemical and biochemical studies on a case of systemic late infantile lipidosis (generalized gangliosidosis). J. Neurochem. **27**, 15-38 (1968).
38. Suzuki, Y., Crocker, A. C. and Suzuki, K.: G<sub>M1</sub>-gangliosidosis: Correlation of clinical and

- biochemical data. *Arch. Neurol.* **24**, 58-64 (1971).
39. Kaback, M. M., Sloan, H. R., Sonneborn, B. S. M., Herndon, R. M. and Percy, A. K.:  $G_{M1}$ -gangliosidosis type I: In utero detection and fetal manifestation. *J. Pediatr.* **82**, 1037-1041 (1973).
40. Lowden, J. A., Cutz, E., Conen, P. E., Rudd, N. and Doran, T. A.: Prenatal diagnosis of  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *N. Engl. J. Med.* **288**, 225-228 (1973).
41. Booth, C. W., Gerbie, A. B. and Nadler, H. L.: Intrauterine detection of  $G_{M1}$  gangliosidosis, type 2. *Pediatrics* **52**, 521-524 (1973).
42. Kudoh, T., Kikuchi, K., Nakamura, F., Yokoyama, S., Karube, K., Tsugawa, S., Minami, R. and Nakao, T.: Prenatal diagnosis of  $G_{M1}$ -gangliosidosis: Biochemical manifestations in fetal tissues. *Hum. Genet.* **44**, 287-293 (1978).
43. Schneck, L., Adachi, M. and Volk, B. W.: The fetal aspects of Tay-Sachs disease. *Pediatrics* **49**, 342-351 (1972).
44. Nilsson, O. and Svennerholm, L.: Characterization of quantitative determination of gangliosides and neutral glycosphingolipids in human liver. *J. Lipid Res.* **23**, 327-334 (1982).
45. Makita, A., Iwanaga, M. and Yamakawa, T.: The chemical structure of human kidney globoside. *J. Biochem.* **55**, 202-204 (1964).
46. Vanier, M. T., Holm, M., Mansson, J. E. and Svennerholm, L.: The distribution of lipids in the human nervous system-V. Gangliosides and allied neutral glycolipids of infant brain. *J. Neurochem.* **21**, 1375-1384 (1973).
47. Wenger, D. A. and Wardell, S.: Action of neuraminidase from *Clostridium perfringens* for Tay-Sachs ganglioside. *Physiol. Chem. Phys.* **4**, 224-230 (1972).
48. Wenger, D. A. and Wardell, S.: Action of neuraminidase (E. C. 3. 2. 1. 18) from *Clostridium perfringens* for brain gangliosides in the presence of bile salts. *J. Neurochem.* **20**, 607-612 (1973).
49. Norden, A. G., Tennant, L. L. and O'Brien, J. S.:  $G_{M1}$  ganglioside  $\beta$ -galactosidase A.: Purification and studies of the enzyme from human liver. *J. Biol. Chem.* **249**, 7969-7976 (1974).
50. Hirabayashi, Y., Taki, T. and Matsumoto, M.: Tumor ganglioside-Natural occurrence of  $G_{M1b}$ . *FEBS Lett.* **100**, 253-257 (1979).
51. Matsumoto, M. and Taki, T.: Further characterization of the structure of  $G_{M1b}$  ganglioside from rat ascites hepatoma. *J. Biol. Chem.* **256**, 9737-9741 (1981).
52. Norton, W. T.: Isolation and characterization of myelin. in *Myelin*, edited by Morell, P. 161-199 Plenum Press, N. Y. (1977).
53. Sweasey, D., Patterson, D. S. P. and Glancy, E. M.: Biphasic myelination and the fatty acid composition of cerebroside and cholesterol esters in the developing central nervous system of the domestic pig. *J. Neurochem.* **27**, 375-380 (1976).
54. Svennerholm, L. and Stållberg-Stenhagen, S.: Changes in the fatty acid composition of cerebroside and sulfatides of human nervous tissue with age. *J. Lipid Res.* **9**, 215-225 (1968).
55. Ho, M. W. and O'Brien, J. S.: Differential effect of chloride ion on  $\beta$ -galactosidase isoenzyme: A method for separate assay. *Clin. Chim. Acta* **32**, 443-450 (1971).
56. 菊地浩一:  $G_{M1}$ -Gangliosidosis の Heterogeniety に関する研究. *札幌医誌* **49**, 462-473 (1980).
57. Suzuki, Y., Nakamura, N. and Fukuoka, K.:  $G_{M1}$ -gangliosidosis: Accumulation of ganglioside  $G_{M1}$  in cultured skin fibroblasts and correlation with clinical types. *Hum. Genet.* **43**, 127-131 (1978).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 石川幸辰